第 33 卷 第 3 期 1990 年 8 月 昆虫学报 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Vol. 33, No. 3 Aug., 1990

七星瓢虫卵黄原蛋白基因的表达：保幼激素类似物对 mRNA 的诱导

翟启慧 龚和 王成 郑文惠

（中国科学院动物研究所，北京）

摘要 在七星瓢虫 (*Coccinella septempunctata*) 中，保幼激素调控脂肪体中卵黄原蛋白基因的表达。蛋白质合成实验证明，保幼激素类似物大幅度地促进取食人工饲料的雌虫脂肪体中卵黄原蛋白的合成。保幼激素类似物的作用有高度选择性，使卵黄原蛋白占总蛋白的百分比提高 12 倍。取食人工饲料的雌虫中，脂肪体 RNA 含量及其转译活性均极低，转译产物中不存在卵黄原蛋白多肽。保幼激素类似物能显著提高脂肪体 RNA 的含量及其中可转译 mRNA 的水平。处理后的雌虫，象蚜虫饲养的成熟雌虫一样，其脂肪体 RNA 能在体外转译系统中指导卵黄原蛋白多肽的合成，并在变性琼脂糖凝胶电泳上显示一条高分子量的带(约 5100 核苷酸)，初步鉴定为卵黄原蛋白 mRNA。由此证明，保幼激素类似物能诱导卵黄原蛋白 mRNA 的出现和积累。

关键词 七星瓢虫 脂肪体 卵黄原蛋白合成 卵黄原蛋白 mRNA 体外转译 保幼激素类似物 人工饲料

卵黄原蛋白 (vitellogenin，以下简称 Vg) 是卵生动物中卵黄蛋白 (vitellin) 前体的通称。昆虫的 Vg 提供了一个研究真核细胞基因表达的良好实验模型，因为 (1) 在昆虫中 Vg 是由成熟雌虫的脂肪体合成，换言之，Vg 基因表达具有性别、发育期和组织的特异性，适于研究基因选择性表达的机理；(2) 在一定条件下，Vg 可大量合成，因而有可能在分子水平上对此蛋白质及其 mRNA 和基因进行分析研究；(3) Vg 合成是受昆虫激素(保幼激素或/和蜕皮激素，因昆虫种类而异)调节的，适合于研究昆虫激素对基因表达的调控。昆虫 Vg 基因表达的研究，在果蝇、飞蝗、蚊虫中，都已做了不少工作，其中有的已深入到基因水平 (Postlethwait 和 Kunert, 1986; Wyatt 等, 1984; Gemmill 等, 1986)。

我们在捕食性天敌七星瓢虫 (*Coccinella septempunctata*) 中，结合饲料的影响和激素的调节，研究 Vg 基因的表达，已在蛋白质水平进行了一系列工作，证明在七星瓢虫中，象在大多数昆虫中一样，Vg 合成是由保幼激素调节的，并揭示了在这种昆虫中，营养状况通过对内分泌系统的活化而影响 Vg 合成(龚和等, 1980、1982b; Zhai 等, 1984; 翟启慧和张建中, 1984; 张建中和翟启慧, 1985; Zhai 等, 1987)。为了逐步阐明保幼激素调控 Vg 基因表达的分子机理，我们已开始在 RNA 水平进行一些研究，包括脂肪体 RNA 的合成及体外转译等(张建中和翟启慧, 1985; 翟启慧等, 1986)。本文主要报道有

本文于 1988 年 5 月收到。

国家自然科学基金资助项目。

张建中、关雪辰同志参加部分工作，于延芬同志摄印照片，特致谢忱。

关保幼激素诱导 Vg mRNA 的实验结果。

材料和方法

一、昆虫饲料和激素处理

七星瓢虫系由田间采集初羽化成虫或采集老熟幼虫，在室内化蛹、羽化为成虫。成虫分别用蚜虫或人工饲料(鲜猪肝:蜂蜜:蔗糖=5:1:1，或鲜猪肝:蔗糖=5:2，重量比)喂养。用人工饲料喂养的雌虫，按实验需要，在一定时间用合成的保幼激素类似物 (RS)-hydroprene (美国 Zoecon 公司)处理。保幼激素类似物(以下简称 JHA) 用丙酮配成 100 微克/微升的溶液，点滴在虫体腹部背板上，每头 1 微升。

二、Vg 及其他蛋白合成的测定

采用体外放射性标记和免疫沉淀的方法测定 Vg 合成，将脂肪体在含 [^{3}H] 亮氨酸(52 居里/毫克分子，上海原子核研究所)的 Grace 培养液中进行体外培养(翟启慧和张建中，1984)。Vg 的合成根据脂肪体和培养液中被特异抗体沉淀的标记 Vg 的计数。总蛋白的合成根据三氯乙酸 (TCA) 沉淀的计数，从其中减去 Vg 的计数，为其他蛋白的合成。

三、RNA 的提取和定量

为了防止核酸酶对 RNA 的降解，玻璃器皿用 1 N NaOH 浸泡后彻底冲洗，或经高压灭菌处理。溶液使用前均经 0.45 微米的微孔滤膜过滤。实验操作时戴医用手套，以免核酸酶污染。

RNA 的提取采用硫氰胍法，按 Chirgwin 等 (1979) 的步骤略加修改以适用于昆虫材料(翟启慧等，1986)。提取所用的材料是连在腹部表皮上的脂肪体，或是去除消化道的离体腹部。

提取的 RNA 样品用紫外分光光度计测定 260 和 280 毫微米的吸光率 (A)。从 A_{260nm}/A_{280nm} 的比率检查 RNA 样品的纯度。根据 (A_{260} × 稀释倍数)/25 = RNA 浓度(毫克/毫升)，计算 RNA 的总量。

四、RNA 的体外转译和转译产物的鉴定

总 RNA 中所含 mRNA 的转译活性是在体外无细胞系统中测定。所用的兔网织红细胞溶胞产物系统按常规方法制备 (Merrick，1983)。然后参考 Pelham 和 Jackson (1976) 的方法，用小球菌核酸酶对溶胞产物进行预处理，去除内源 mRNA 的活力，得到依赖于外源 mRNA 的转译系统。预处理的反应混合物及步骤详见翟启慧等(1986)。

体外转译反应的具体条件和步骤同翟启慧等 (1986)。转译活性根据放射性氨基酸 ([^{35}S] 甲硫氨酸，> 800 居里/毫克分子，英国 Amersham 公司) 参入热 TCA 不溶物的计数。

转译产物用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分析。然后按 Bonner 和 Laskey (1974) 的方法进行萤光显影，并对底片进行光密度扫描，以显示放射性标记的多肽。转译产物中的 Vg 根据其迁移率确定，以纯化的七星瓢虫 Vg 为标准。

五、RNA 电泳

将提取的 RNA 按 Bailey 和 Davidson (1976) 的方法进行琼脂糖平板凝胶电泳。

以甲基汞氢氧化物（methylmercuric hydroxide CH_3HgOH）作为变性剂。凝胶厚度 2.5 毫米。电泳完毕凝胶用溴化乙锭染色，在紫外光下观察并照相。

结　　果

一、保幼激素类似物促进 Vg 合成

在过去工作的基础上，为了进一步验证 JHA 对 Vg 合成的选择性促进作用，我们测定了三组不同瓢虫的脂肪体中 Vg、其他蛋白及 TCA 沉淀总蛋白的合成。这三组瓢虫是：（1）用蚜虫喂养 10—15 天的成熟雌虫；（2）用人工饲料喂养一个月的雌虫；（3）用人工饲料喂养 10—15 天后点滴 JHA，再继续喂以人工饲料至一个月的雌虫。从表 1 可以看到，取食人工饲料的雌虫中，Vg 合成尚不及取食蚜虫的成熟雌虫中的 3%。经过 JHA 处理，Vg 合成大幅度提高，明显超过了蚜虫组。其他蛋白的合成，在取食人工饲料时被抑制的程度，以及 JHA 处理后提高的程度均远不如 Vg 合成显著。Vg 在总蛋白中所占的比例，在取食人工饲料时仅为 4.5%，经 JHA 处理后提高到 56%（12.4倍），明显高于蚜虫组。这些结果都表明，JHA 对 Vg 合成的促进虽不是绝对专一，但具有高度选择性，与我们过去的结果是一致的（张建中和翟启慧，1985）。

表 1　JHA 对脂肪体 Vg 合成的促进

组　别	[³H] 亮氨酸相对参入量			Vg 占总蛋白的%
	Vg	其他蛋白	总蛋白	
蚜　虫	100	100	100	34
人工饲料	2.9	31	21	4.5
人工饲料＋JHA	126	51	77	56

二、JHA 提高脂肪体 RNA 的含量及转译活性

我们从表 2 所列各种不同成虫的脂肪体或去除消化道的腹部提取了总 RNA。除个别情况外，所提 RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 均在 1.8 以上。根据 RNA 的紫外吸收曲线，A_{260}/A_{280} 应在 2 左右，因此我们制备的 RNA 样品纯度较高。

根据 A_{260} 计算了每头成虫脂肪体中 RNA 的含量。从表 2 可以看到，在初羽化的雌虫中，RNA 含量较低，取食蚜虫后，在卵巢尚未成熟前，RNA 含量即明显上升。当卵巢成熟时，RNA 含量提高到初羽化时的 3 倍左右。用人工饲料喂养的雌虫，其 RNA 含量反而比初羽化时有所下降。用 JHA 处理后，RNA 含量上升 3—4 倍，但因其卵巢并未完全成熟，故仍低于取食蚜虫的成熟雌虫。此外，雄虫的 RNA 含量明显低于雌虫。

以上结果说明脂肪体 RNA 的含量与性别、发育期和营养状况有密切关系。JHA 能大大提高取食人工饲料雌虫脂肪体的 RNA 含量。这与我们过去已报道的 JHA 提高脂肪体中 [³H] 尿嘧啶核苷的参入，促进 RNA 的合成（张建中和翟启慧，1985），是完全一致的。

我们将提取的 RNA 在兔网织红细胞溶胞产物系统中进行体外转译，测定不同来源的 RNA 中能指导蛋白质合成的 mRNA，即可转译 mRNA 的水平。表 2 所示结果表

表 2 脂肪体 RNA 的含量及体外转译活性

RNA 来源	A_{260}/A_{280}	RNA 含量（微克/头）	转译活性		转译产物中 Vg 的鉴定
			CPM/微克 RNA	相对%	
初羽化雌虫腹部	2.13	11.5	10679	80	−
蚜虫，未成熟雌虫腹部	2.05	21	12116	90	−
蚜虫，成熟雌虫腹部	1.99	32	12928	100	+
蚜虫，成熟雌虫脂肪体	1.87	35	13779		+
人工饲料，不成熟雌虫脂肪体	1.62	7	6097	45	−
人工饲料＋JHA 雌虫脂肪体	1.94	22	11692	96	+
人工饲料＋JHA 雌虫脂肪体	1.96	28	14008		+
人工饲料＋JHA 雌虫脂肪体	1.84	23	12726		+
雄虫腹部	1.94	13	12869	96	−

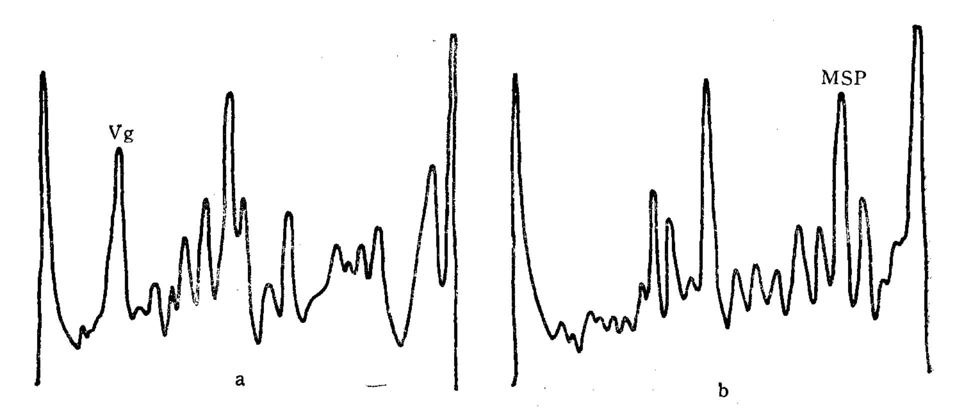


图 1 脂肪体 RNA 在体外系统中的转译产物，其 SDS-PAGE 萤光显影谱的扫描曲线
a. 取食蚜虫的成熟雌虫 Vg: 卵黄原蛋白多肽 b. 雄虫 MSP: 雄性特异多肽

明，在正常情况下，雌虫在羽化时 mRNA 就有较高的转译活性，在卵巢成熟过程中逐渐上升。如以成熟雌虫的转译活性为 100%，则初羽化时为 80%，成熟前为 90%。人工饲料喂养的雌虫中，RNA 的转译活性很低，仅为取食蚜虫的成熟雌虫的 45%，表明其中可转译 mRNA 的量很少。JHA 处理后，RNA 的转译活性增加一倍，达到成熟雌虫的 96%，证明 JHA 能显著提高可转译 mRNA 的水平。

三、JHA 诱导 Vg mRNA 的出现和积累

我们将不同来源 RNA 的转译产物（即在体外系统中所合成的各种蛋白质），用 SDS-PAGE 进行分析和萤光显影。从显示在X光底片上的一系列放射性标记的多肽中，根据与标准 Vg 迁移率的对比，检查有无 Vg 多肽，从而判断 Vg mRNA 是否存在。从表 2 可以看出，在雄虫、初羽化雌虫和未成熟雌虫的 RNA 转译产物中，均不存在 Vg。只有成熟雌虫的 RNA 才能转译 Vg 多肽，表明有 Vg mRNA 的存在。取食人工饲料的雌虫 RNA，不能转译 Vg。JHA 处理后，转译产物中可鉴定出 Vg 多肽，这证明

JHA 能诱导 Vg mRNA 的出现和积累。

图 1 是取食蚜虫的成熟雌虫和雄虫的 RNA 在体外系统中的转译产物的扫描曲线。雌雄两者最明显的差别是：(1) 雌虫中有 Vg 多肽，而雄虫中没有；(2) 雄虫中有一个小分子的多肽，不存在于雌虫中。这一未见报道的雄性特异多肽尚待鉴定。图 2 是取食人工饲料的雌虫在 JHA 处理前后 RNA 体外转译产物的对比，可以清楚地看到 JHA 处理后出现的 Vg 多肽。将 JHA 处理后的转译产物(图 2 b) 和取食蚜虫的成熟雌虫的转译产物(图 1 a) 进行对比，虽然两者是用不同的光密度计和不同的条件进行的扫描，但两条曲线的型式是完全一致的。这说明取食人工饲料的雌虫经过 JHA 处理，不仅其 RNA 的转译活性几乎可达到取食蚜虫的成熟雌虫的水平(表 2)，而且转译产物也完全相同。

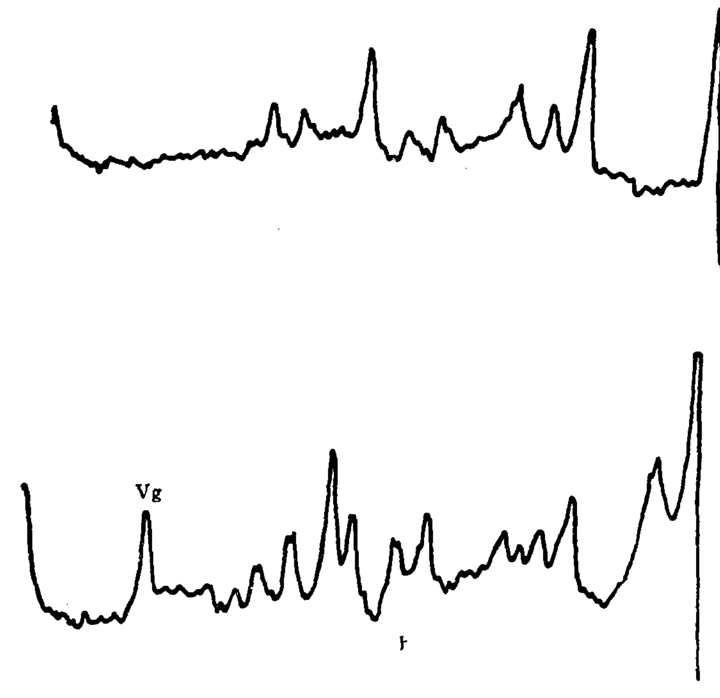
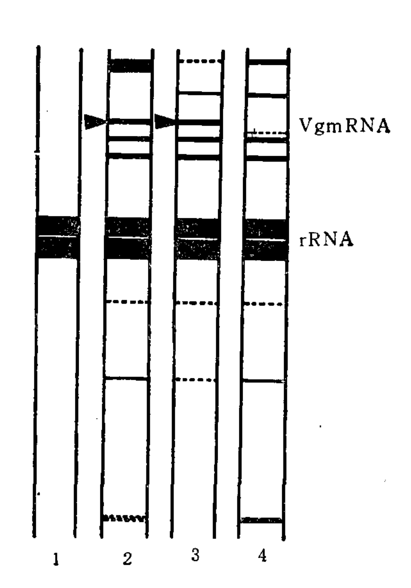


图 2　取食人工饲料的雌虫在 JHA 处理前后脂肪体 RNA 的体外转译产物，其 SDS-PAGE 萤光显影谱的扫描曲线
上为 a. 处理前　下为 b. 处理后　Vg：卵黄原蛋白多肽

七星瓢虫的 Vg 由四个多肽组成，其分子量分别为 133、130、46、43 KD (Zhai 等，1984)。我们在兔网织红细胞溶胞产物系统中转译的 Vg 多肽，在 SDS-PAGE 上其迁移率相当于 Vg 的大亚单位 133/130 KD[两个大亚单位分子量相近，只有在合适的梯度凝胶上，而且含量很少的情况下才能分开 (Zhai 等，1984)]。我们未能从转译产物中鉴定出迁移率相当于 Vg 的两个小亚单位的多肽。上述结果曾用免疫沉淀实验加以证实 (结果未示)。

四、脂肪体 Vg mRNA 的初步鉴定

将不同来源的 RNA 在变性条件下进行琼脂糖凝胶电泳分析，结果如图 3 所示。在



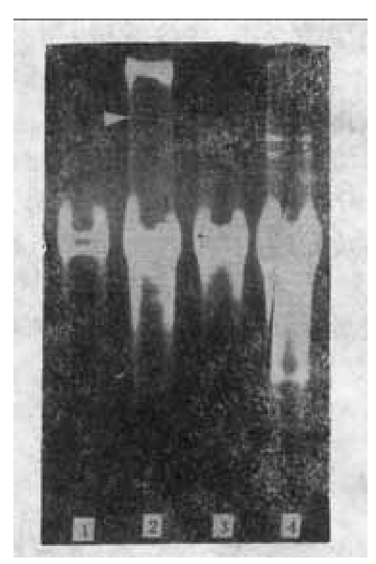


图 3 脂肪体 RNA 的变性琼脂糖凝胶电泳谱及其示意图
1.雄虫，0.7 微克 RNA 2.成熟雌虫，4.6 微克 RNA 3.JHA 处理雌虫，4.4 微克 RNA 4.不成熟雌虫，6.6 微克 RNA
箭头示 Vg mRNA

昆虫中普遍存在大 rRNA 分子的断裂（Applebaum 等，1981；Chinzei 等，1982），七星瓢虫的大 rRNA 分子也同样分裂为 2 个片段，与 18 S rRNA 的迁移率很相近，只在加样较少的情况下才能分开。在提取过程中，tRNA 已被除去，但 5 S RNA 在加样较多时清晰可见。在 rRNA 以上有数条高分子量的带，其中有一条带只存在于取食蚜虫的成熟雌虫和取食人工饲料经 JHA 处理的雌虫的 RNA 中，而不存在于雄虫或不成熟雌虫的 RNA 中。以鼠肝 rRNA（28 S 和 18 S）及大肠杆菌 rRNA（23 S 和 16 S）为标准，由迁移率计算出此带约为 30 S。我们按 Chinzei 等（1982）计算飞蝗 Vg mRNA 所用的数据(鼠肝 rRNA 分别为 4400 及 1980 核苷酸，大肠杆菌 rRNA 分别为 2904 及 1541 核苷酸)，计算出此带的长度约为 5100 核苷酸。

我们根据此带的出现和大小初步确定它就是 Vg mRNA，因为 (1) 它只出现于成熟雌虫和经 JHA 处理后的卵黄发生雌虫的脂肪体 RNA 中，这些 RNA 在体外转译系统中均能指导 Vg 的合成(表 2，图 1、2)；(2) 从七星瓢虫 Vg 的氨基酸组分（龚和等，1982a）计算其氨基酸平均分子量为 113，转译分子量为 133/130 KD 的 Vg 多肽所需的最低核苷酸数目为 3450—3530 (不包括 poly (A) 尾和不转译顺序)。因此 5100 核苷酸这一长度足够转译 133/130 KD 的 Vg 多肽。

讨 论

本文证明在七星瓢虫中，JHA 能有效地激活脂肪体的 Vg 基因。Vg 合成和 mRNA 转译的实验结果均表明，当用一种简单的基础人工饲料喂养时，雌虫脂肪体的 Vg 基因处于一种几乎不活动的状态。在 JHA 的选择性作用下，Vg 基因被启动，进行

转录，从而使 Vg mRNA 大量积累。因此，这种取食基础人工饲料的雌虫为我们提供了研究激素诱导 Vg 基因表达的实验模型。

Vg 是一种分泌蛋白。在昆虫中，Vg 在脂肪体细胞合成后，被分泌到血淋巴中，供发育中的卵母细胞选择摄取（龚和和翟启慧，1979）。根据 Blobel 的信号假说，分泌蛋白合成时，原始转译产物应是一个分子量较大的前体，在蛋白酶的作用下，被水解切去一段信号肽，加工为成熟的蛋白（Blobel 等，1979）。我们过去在脉冲-追踪实验中未能观察到 Vg 多肽的前体。本文中体外转译实验的结果证明，Vg mRNA 的转译产物和 Vg 多肽的迁移率相同。这些结果说明在七星瓢虫 Vg 的信号顺序很短，不足以影响在 SDS-PAGE 上的迁移率。在昆虫其他蛋白中也有类似情况（Tahara 等，1982）。

在大多数昆虫中，Vg 由大小两组亚单位组成（Harnish 和 White, 1982）。七星瓢虫的 4 个 Vg 多肽，按其分子量也可分为大小两组。这些大小不同的多肽，是不同 mRNA 的转译产物，还是由同一 mRNA 转译后加工而成的呢？从已报道的结果来看，在不同昆虫中情况不同。在飞蝗中鉴定了一个 6300 核苷酸的 Vg mRNA，能转译 200 KD 左右的 Vg 多肽，但没有发现长度适于转译 40—50 KD 小多肽的 mRNA，表明小多肽是由大的前体加工而来的（Wyatt 等，1984）。而在家蚕中，Vg 的大、小亚单位（180、42 KD）是由两个 mRNA 分别转译的（Izumi 和 Tomino，1983）。在七星瓢虫中，我们初步鉴定了一个能转译 Vg 大亚单位的 mRNA，小的 Vg 多肽是由同一 mRNA 转译后加工而成，还是有其单独的 mRNA，尚待进一步研究。

参 考 文 献

张建中、翟启慧 1985 七星瓢虫的卵黄发生：保幼激素类似物对卵黄原蛋白合成的调节。昆虫学报 **28**(2)：121—8。

龚 和、翟启慧 1979 昆虫卵黄原蛋白和卵黄发生。昆虫学报 **22**(2)：219—36。

龚 和等 1980 七星瓢虫的卵黄发生：卵黄原蛋白的发生和取食代饲料的影响。昆虫学报 **23**(3)：252—9。

龚 和等 1982a 七星瓢虫卵黄蛋白的理化性质。昆虫学报 **25**(1)：9—15。

龚 和等 1982b 七星瓢虫卵黄原蛋白的合成。动物学集刊 **2**：175—81。

翟启慧、张建中 1984 七星瓢虫的卵黄发生：体外培养的脂肪体中卵黄原蛋白的合成。昆虫学报 **27**(4)：361—7。

翟启慧等 1986 七星瓢虫卵黄原蛋白基因的表达：mRNA 的体外转译。生物化学杂志 **2**(1)：59—66。

Applebaum, S. W. et al. 1981 The preparation and characterization of locust vitellogenin messenger RNA and the synthesis of its complementary DNA. *Biochem. J.* **193**: 209—16.

Bailey, J. M. & Davidson, N. 1976 Methylmercury as a reversible denaturing agent for agrose gel electropheresis *Analyt. Biochem.* **70**: 75—85.

Blobel, G. et al. 1979 Translocation of protein across membrane: the signal hypothesis and beyond. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **33**: 9—36.

Bonner, W. M. & Laskey, R. A. 1974 A film detection method for tritium-labelled protein and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**: 83—8.

Chinzei, Y. et al. 1982 Vitellogenin mRNA in locust fat body: identification, isolation, and quantitative changes induced by juvenile hormone. *Can. J. Biochem.* **60**: 243—51.

Chirgwin, J. M. et al. 1979 Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294—9.

Gemmill, R. M. et al. 1986 Isolation of mosquito vitellogenin genes and induction of expression by 20-hydroxyecdysone. *Insect Biochem.* **16**: 761—74.

Harnish, D. G. & White, B. N. 1982 Insect vitellins: Identification, purification, and characterization from eight orders, *J. Exp. Zool.* **220**: 1—10.

Izumi S. & Tomino, S. 1983 Vitellogenin synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*: Separate mRNAs encode two subunits of vitellogenin. *Insect Biochem.* **13**: 81—5.

Merrick, W. C. 1983 Translation of exogenous mRNA in reticulocyte lysates. In: Methods in Enzymology, Vol. **101**, 606—15.

Postlethwait, J. H. & Kunert, C. J. 1986 Endocrine and genetic regulation of vitellogenesis in Drosophila. In: Ralph C. (ed.) Comparative Endocrinology: Development and Directions. Alan Liss, New York, pp. 33—52.

Tahara, T. et al. 1982 Identification of storage protein messenger RNA of the fleshfly *Sarcophaga peregrina*. *Biochem. J.* **203**: 571—5.

Wyatt, G. R. et al. 1984 The vitellogenin genes of *Locusta migratoria* and other insects. *Adv. Invertebr. Reprod.* **3**: 73—80.

Zhai, Q. H. et al. 1984 Vitellogenin synthesis in the lady beetle *Coccinella septempunctata*. *Insect Biochem.* **14**: 299—305.

Zhai, Q. H. et al. 1987 Regulation of vitellogenin synthesis by juvenile hormone analogue in *Coccinella septempunctata*. *Insect Biochem.* **17**: 1059—64.

EXPRESSION OF VITELLOGENIN GENES IN *COCCINELLA SEPTEMPUNCTATA*: INDUCTION OF mRNA BY JUVENILE HORMONE ANALOGUE

ZHAI QI-HUI GONG HE WANG CHENG ZHENG WEN-HUI

(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing*)

The expression of vitellogenin (Vg) genes in fat body of adult female *Coccinella septempunctata* is regulated by juvenile hormone. When adult females were fed with a basic artificial diet, synthesis of Vg was inhibited by 97% and stimulated to 26% above the normal by administration of (RS)-hydroprene. The action of hydroprene is highly selective, causing a 12-fold increase in the proportion of Vg in total protein.

In adult females feeding on artificial diet, not only the content, but also the translational activity of fat body RNA were very low. No Vg polypeptides could be detected in the translation product. Treatment with hydroprene caused 3—4 times increase in RNA content and doubled the level of translatable mRNA. Fat body RNA from hormone-treated females directed the synthesis of larger Vg polypeptides in a mRNA-dependent reticulocyte lysate system, as did the RNA from the reproductive females reared with aphids.

Agrose gel electrophoresis of denatured fat body RNA from reproductive and hormone-treated females showed the presence of a high-molecular-weight band (5100 nucleotides), which was absent from the RNA of male and untreated female fat body. The occurrence and size of this band suggested that it was Vg mRNA.

The results demonstrated that the Vg genes in the fat body of females on artificial diet are in an almost inactive state, and they are turned on in the presence of juvenile hormone, so that Vg mRNA accumulates.

Key words *Coccinella septempunctata*——fat body——vitellogenin synthesis——vitellogenin mRNA——*in vitro* translation——juvenile hormone analogue——artificial diet